

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08688

研究課題名(和文) スーパーアパタイトナノ粒子法を用いたmiRNAによる胃癌腹膜播種治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a peritoneal dissemination treatment for gastric cancer by miRNA using super carbonate nanoapatite

研究代表者

坂本 宣弘 (Sakamoto, Nobuhiro)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：50722617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗アポトーシス分子としてBCL2を標的分子として、生体内で分解されにくいAmNA型 Bcl-2 ASO(アンチセンスオリゴ)を設計した。多数のアンチセンス鎖の中から4種類のアンチセンス鎖がMKN45細胞において高いBCL2ノックダウン効果を示した。中でもASO#2は低濃度シスプラチンとASO#2を併用した場合、シスプラチン単独に比べて有意に強い細胞増殖抑制がみられた。Western blotではシスプラチン投与下でもASO#2の併用によってBcl-2蛋白の減少が72時間維持されていた。このアンチセンスは腹膜播種治療の手段となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌は世界でも癌の死因の4位となっている。特に、腹膜播種は胃癌再発の約半数に生じるものの、有効な治療手段のない難治性の病態であり、腹膜播種治療に大きな進歩をもたらすには、新規治療薬の開発が必要である。本研究で開発した細胞死抵抗性遺伝子Bcl2の産生を阻害するASO#2配列は胃癌に対する新しい治療剤となることが期待される。核酸のデリバリーとしてはスーパーアパタイト遺伝子導入法が期待される。

研究成果の概要(英文)：Peritoneal dissemination of gastric cancer is a serious disease with no effective treatment. In this study we examined effect of siRNA for anti-apoptotic survivin and Bcl2 antisense oligo (ASO) in MKN45 gastric cancer cells. siRNA treatment for survivin did not work well and we designed and tested antisense sequence (AmNA type) for Bcl2 mRNA. Among many candidates we eventually chose 4 sequences after many validation steps using RT-PCR and western blotting in hepatoblastoma cells and HCT116 cells. ASO#2 displayed superior tumor inhibitory effect in combination with low dose cisplatin in MKN45 gastric cancer cells. The knockdown effect sustained for 72 h. This ASO may be a useful nucleic medicine for peritoneal dissemination of gastric cancer. To improve in vivo transduction efficiency, an EPR facilitating super carbonate apatite system may be useful.

研究分野：胃癌、核酸医薬

キーワード：胃癌 Bcl2 腹膜播種

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胃癌は世界でも癌の死因の4位となっている。特に、腹膜播種は胃癌再発の約半数に生じるものの、有効な治療手段のない難治性の病態である。

腹膜播種が治療抵抗性である理由として、血液腹膜関門の存在による薬剤の腹腔内移行の悪さや、播種結節内における厚い間質形成や高い組織圧による薬剤の血管遠位への浸透の悪さが挙げられる (Jacquet P, et al. Acta Chir Belg 1994)。パクリタキセルの良好な腹腔内移行性が指摘されるようになり、JCOG0407 試験で paclitaxel は腹膜転移症例の腫瘍増大の抑制には有効であったが、全生存率の延長には寄与しなかった。腹膜播種治療に大きな進歩をもたらすには、新規治療薬の開発が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、抗アポトーシス分子 survivin や Bcl2 に対する siRNA を胃癌細胞に作用させシスプラチンやパクリタキセルの効果を増強することで胃癌の腹膜播種に対して有効な治療法を開発することである。近年、薬剤の腫瘍選択性の向上や副作用の軽減を目的とした DDS (Drug delivery system) の開発が盛んとなっている。DDS は、腫瘍の未熟な血管内皮細胞の間隙から 100nm-200nm 程度の粒子が血管外に漏出・蓄積する EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果を利用して、腫瘍に効率よく治療効果をもたらすものである。様々な癌腫で DDS 製剤の開発が進み、臨床化されているものも多い。一方で、腹膜播種をターゲットとした DDS 製剤の開発は進んでいない。その理由として、既存の liposome や micelle といった DDS 製剤は、厚い間質を有する腹膜播種の深部まで到達できないことが一因と考えられる。その中でリン酸カルシウム法をベースとした super carbonate apatite ナノ粒子は炭酸、リン酸、カルシウムのシンプルな材料からなるイオン体を形成し、腫瘍局所で強い EPR 増強作用を発揮することが分かっている。腹膜播種へ薬剤を送達する工夫として播種巣全体への EPR 効果の波及を狙って本研究では DDS として super carbonate apatite を利用することを計画した。

### 3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株として MKN45 を、抗癌剤として CDDP シスプラチンを用いた。細胞数のカウントは WST-8 キットを用いた。

(2) 抗アポトーシス分子である Survivin siRNA をリポフェクタミンを用いて MKN45 にトランスフェクションし、ウエスタンブロットで survivin 蛋白のノックダウン効果について検討した。またシスプラチンとの併用効果について検討した。

(3) Bcl2 antisense を設計し、候補配列をリポフェクタミンを用いて MKN45 にトランスフェクションし、ウエスタンブロットで Bcl2 蛋白のノックダウン効果について検討した。シスプラチンとの併用効果について検討した。

(4) 胃癌腹膜播種モデルマウスは、4週齢・メスの BALB/cAJcl nude マウス (CLEA Japan) を使用し、MKN45-Luc を  $3 \times 10^6$  個/PBS 1mL を腹腔内注射し作製した。IVIS で体外から腹膜播種の程度を評価した。Super carbonate apatite 単独とシスプラチンとの併用、核酸を内包した Super carbonate apatite とシスプラチンとの併用について検討する。

### 4. 研究成果

(1) 胃癌細胞 MKN45 に対して、シスプラチンの効果を Cell Proliferation Assay を行い IC50 を求めた。

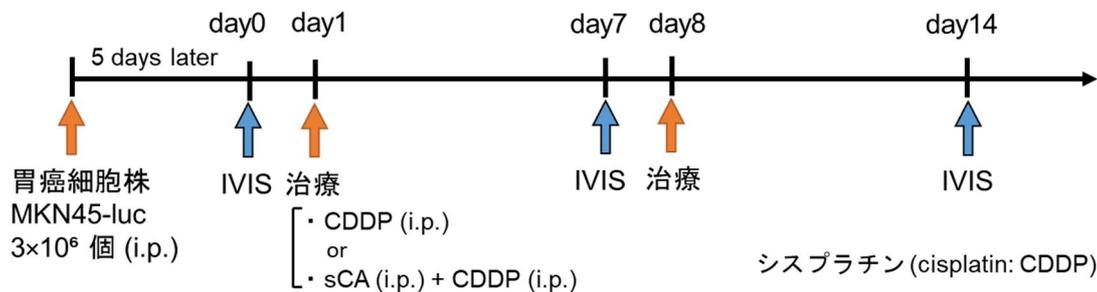
(2) Survivin の発現を siRNA によって阻害し、Western Blotting にて蛋白レベルの低下を確認した。次にシスプラチンと survivin siRNA のコンビネーションで MKN45 に対する細胞障害性を検討したがシスプラチン単独群に比べて survivin ノックダウン併用群による有意な細胞増殖抑制の上乗せ効果は認めなかった。

(3) 抗アポトーシス分子として、過去にシスプラチンとの相乗効果が示されている BCL2 を標的分子として、生体内で分解されにくい AmNA 型 Bcl-2 ASO (アンチセンスオリゴ) を設計し実用化への可能性を探ることとした。多数のアンチセンス鎖の中から4種類のアンチセンス鎖が MKN45 細胞において高い BCL2 ノックダウン効果を示した。中でも濃度依存性に BCL2 の発現を抑制し、シスプラチンの抗腫瘍効果を有意に増幅させた ASO#2 を最終候補として選抜した。低濃度シスプラチン (1  $\mu$ M, 2.5  $\mu$ M) と ASO#2 を併用した場合、いずれの濃度でもシスプラチン単独に比べて有意に強い細胞増殖抑制がみられた。Western blot ではシスプラチン投与下でも ASO#2 の併用によって transfection 後 72 時間で Bcl-2 蛋白の減少が維持されていた。

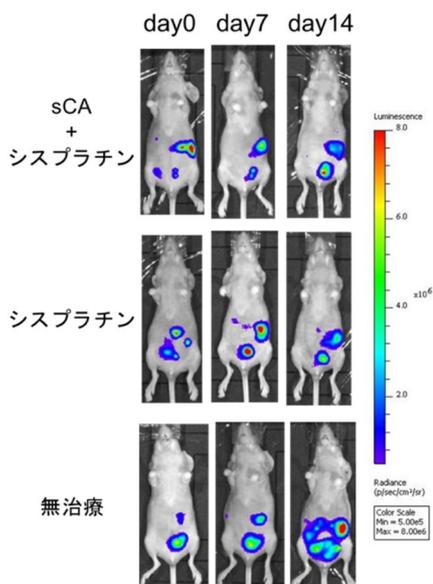
(4) Super apatite 単独でも EPR 効果増強作用があることから、in vivo 実験ではまずマウスに腹膜播種モデルを作成し、シスプラチンを i.p. し、super apatite の投与あり無しで抗腫

瘍効果に違いがみられるかどうかを検討した( 図 1 )。

(A) 実験スキーム



(B) 腹膜播種のイメージング



(C) 腹膜播種の定量

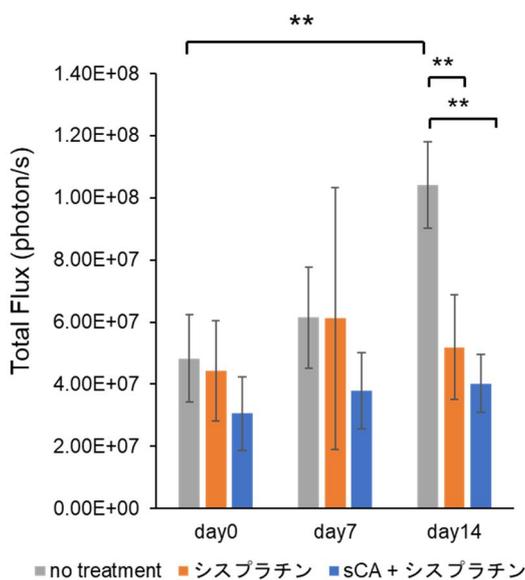


図 1 . がん腹膜播種モデルマウスにおける sCA 併用

によるシスプラチンの抗腫瘍効果の検討

(A) 実験スキーム：治療は day1, day8 の 2 回行い、IVIS は day0,7,14 に撮影した。(B) 腹膜播種のイメージング。治療開始前日 (day0)、治療開始 7 日目 (day7)、14 日目 (day14) に IVIS にて測定した。(C) 腹膜播種の定量。イメージング画像において、ROI を設定し発光量を定量した (\*\*P < 0.01)。

結果として day14 でシスプラチン単独よりも super apatite をシスプラチンに併用した方が播種病巣はよく抑えられたが、ばらつきがあるために有意差には至らずマウスの匹数を増やして検討する必要がある。

(今後の課題) 初年度に survivin を標的とした検討でうまくいかずに時間を要したため、Bcl2ASO を用いたシスプラチン併用に関する in vivo 実験にまでは至らなかった。ASO の有効な配列は決定できているので引き続き検討を行なってゆく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	瀧口 修司  (Takiguchi Shuji)  (00301268)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授   (23903)	
研究分担者	石黒 秀行  (Ishiguro Hideyuki)  (10363920)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授   (23903)	研究分担者より削除
研究分担者	山本 浩文  (Yamamoto Hirohumi)  (30322184)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	
研究分担者	藤幡 士郎  (Hujihata Shiro)  (10825483)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員   (23903)	
研究分担者	小川 了  (Ogawa Ryo)  (70423853)	名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師   (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------